生物技術

生物安全

利用阻抗流式細胞儀 (Impedance flow cytometry) 評估油菜花粉活力 基改作物花粉流佈是外源基因逃逸的主要渠道，花粉活力決定與近緣野生物種之雜交能力，花粉粒徑大小則決定了飄散距離，因此基改作物花粉性狀評估，對於花粉飄散模式之建立顯得相當重要。本研究以「鳳試 1001」和「農興 80 天」兩品種油菜之花粉作為材料，利用阻抗流式細胞儀 (IFC) 針對花粉活力及花粉粒大小，開發高通量檢測技術。在 12 MHz 的條件下，可以清楚區分死亡與具有活力的花粉活性；在 2 MHz 的條件下，配合不同粒徑的聚苯乙烯微珠可有效估算花粉粒徑。與傳統雙醋酸螢光法 (fluorescein diacetate, FDA) 或離體萌芽 (*In vitro* germination) 結果相比，IFC 所測得活力最高，分別是 FDA 和離體萌芽的 1.6~2.0 倍，顯示傳統方法的樣品前處理過程中，常受花粉樣本品種特性干擾，在數據計算與評估上則會受人為主觀判斷因素影響，造成花粉活力的低估，這也凸顯了 IFC 檢測方式的標準化、客觀化特質，且 IFC 已被證實可分析多種類型植物花粉活力，1 個小時可分析 30 個以上的樣品，非常適合大量花粉樣品活力之檢測，有助於基改作物花粉特性檢測，加速花粉飄散模式之建立。

種原庫番茄 RAD capture 文庫之建構 為完成國家種原庫 5,000 份番茄蒐集系之次世代定序與基因型分型工作，利用限制性切位相關 DNA 定序 (restriction site associated DNA sequencing, RAD seq) 概念，針對基因組內 *Pst*I 酵素酶切位點進行雙端 (paired end) 定序，可大幅降低基因組的複雜度，適合大量樣本混合分析，本研究繼續導入有助簡化基因組定序文庫的 sequence capture 策略，去除非專一性核酸片段，建構 RAD capture 定序文庫，藉此增加文庫中每個樣品酶切位點的定序深度。本研究共計完成種原庫 5,184 個番茄樣本之基因組 DNA 萃取，每個文庫構築時選取 96 個樣本之基因組 DNA，經 *Pst*I 酵素酶切完成後，接上帶有 internal barcode 與 biotin 標定之 adaptor，將 96 個樣本混合後進行隨機斷裂 (random shearing)，再配合包覆 streptavidin 的磁珠將成功接合 adaptor 的片段回收，回收之片段經過切補平反應後接上 Illumina 定序平台專用的 P5 與 P7 adaptors，其中 P5 adaptor 上含有 index barcode，可將每次上機的混合樣品數量提升為 384 個，建構完成之定序文庫會利用脈衝式自動核酸片段分離回收系統 (bluePippin) 篩選 250~400 bp 片段，確認文庫濃度、品質後，以 Illumina HiSeq 2,500 進行定序。序列資料分析後 5,000 份番茄種原共獲得 26 億以上的讀序，經品質篩選後保留 85% 以上序列，與參考序列比對可確認 98% 以上定序資料，共計 193,854 個基因座，平均每個樣品基因座涵蓋率為 4.1 倍，SNP 合計有 118,668 個，可進行後續番茄種原基因型分群或核心種原建立之用途。

定量 PCR 技術鑑定香蕉萎縮病毒之研究 香蕉萎縮病 (bunchy top disease of banana) 為目前全球最嚴重的香蕉病毒病害，此病也是臺灣普遍具破壞性之香蕉病毒病害，並曾在中部造成數度大流行，對臺灣香蕉產業形成相當的威脅。此病害由香蕉萎縮病毒所造成 (*banana bunchy virus*, BBTV)，病毒顆粒外觀為二十面體的球型病毒。本研究試驗 BBTV 接種流程，開發 BBTV 接種方法之建立。首先試驗蚜蟲之接種數量，蚜蟲使用數量條件分別 5 及 10 隻，接種後之植株萃取總核酸進行 BBTV 檢測，經 PCR 與瓊脂凝膠電泳分析結果顯示，發現利用 5 隻蚜蟲傳遞病毒並無法達到 100% 罹病率，本研究使用即時螢光定量 PCR 技術，應用於鑑定香蕉感染 BBTV 與否之檢測。本技術發展之即時螢光定量 PCR 技術為同時利用一段含有 *BBTV-CP* 基因之引子和探針，以利用 real-time PCR(qPCR) 法與 TaqMan 螢光探針鑑定，作為鑑定 BBTV 外，並區分香蕉其他病毒 (香蕉條斑病毒及胡瓜嵌紋病毒) 及不與健康組織有反應 (圖 3-1)。與傳統 PCR 方法做比較，顯示本技術靈敏度提高達 1,000 倍以上。在試驗接種條件過程，利用傳統 PCR 及 qPCR 法一併檢測接種後不同時期 BBTV 核酸含量，結果發現傳統 PCR 及 qPCR 法皆比外觀病徵觀察早時期得知感染 BBTV，仍可檢測出此病毒之優點。本技術將可應用在植株感染病毒早期檢測、篩選抗 BBTV 之香蕉品系及田間植株之病害檢測之判定及作為健康香蕉種苗生產與驗證。

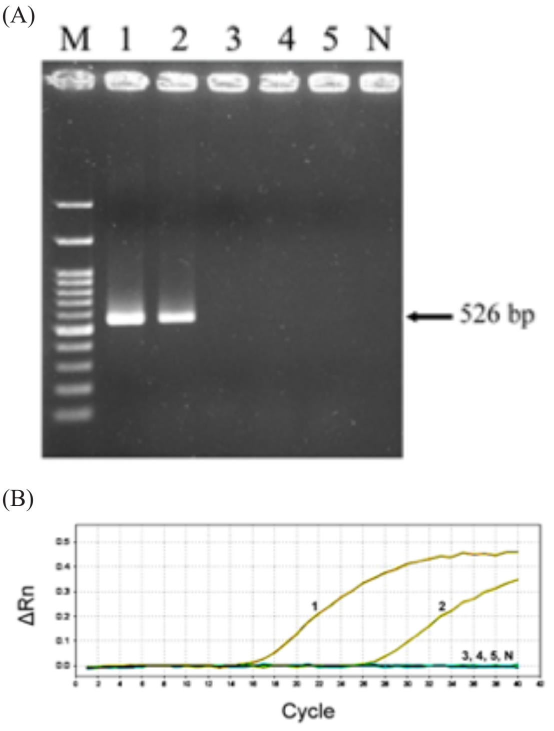

圖 3-1 使用 PCR(A) 和 real-time PCR；(B) 偵測 BBTV 之專一性試驗。

組織培養

兩種優良甘藍品種之小孢子培養與雙單倍體生產 甘藍是臺灣重要的葉菜類蔬菜，利用小孢子培養生產雙單倍體（doubled haploid, DH）植株，可大幅縮短 F_1 育種所需之純系親本的育成時間。本研究針對「初秋」和「臺中 2 號」兩個優良甘藍品種，比較供試植株開花時之栽培溫度、花蕾所在之花序位置以及小孢子處理溫度等條件對改善小孢子胚分化率之影響。研究結果顯示「初秋」和「臺中 2 號」甘藍開花株在 15℃ /10℃（日 / 夜）栽培溫度下較 20℃ /15℃表現出較高之小孢子生成量（表 3-1），此外取自側生花序之花蕾較取自頂生花序之花蕾亦表現出較高之小孢子生成量（表 3-2），但開花株栽培溫度以及花蕾所在之花序位置兩因子對小孢子的胚形成率並無明顯之影響效果。兩品種中以「初秋」的胚分化力較高，將「初秋」甘藍小孢子以 32℃處理 1~3 天，小孢子之胚分化率在 1~2 天處理間差異不大，但處理延長至 3 天則會導致胚分化率下降（表 3-3）。將「初秋」甘藍小孢子處理溫度從 32℃提高到 34℃處理 1 天，胚分化率明顯由 0.2 胚 / 皿提高至 2.0 胚 / 皿（表 3-4）。以流式細胞儀檢測「初秋」甘藍的 DH 植株比率為 43.1%（表 3-5），續將單倍體小苗以 1.2 mM 秋水仙素處理 2 天，染色體倍加比率（2N）為 38.5%（表 3-6）。

表 3-1 開花株之栽培溫度對甘藍小孢子胚形成之影響 [z]

Cultivar	Blooming temperature(℃)	Bud numbers	Microspores /buds	Embryos/plate
K-Y Cross	20/15	48	17 x10^4	1.33 a[y]
	15/10	48	19 x10^4	1.34 a
Taichung No. 2	20/15	50	14 x10^4	0.03 b
	15/10	50	15 x10^4	0.17 b

[z] Microspore culture medium was 1/2 NLN-13 with 4 × 10^4 microspores per mL.

[y] Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

表 3-2 取自頂生花序或側生花序之甘藍花蕾對小孢子胚形成之影響 [z]

Cultivar	Inflorescence position	Bud numbers	Microspores/ buds	Embryos/ plates
K-Y Cross	Terminal	35	9.5 x10^4	1.07 a[y]
	Axillary	48	19.0 x10^4	1.34 a
Taichung No. 2	Terminal	25	9.8 x10^4	0.04 b
	Axillary	48	14.5 x10^4	0.17 b

[z , y] same as Table 3-1.

表 3-3 溫度處理天數對甘藍小孢子胚形成率之影響 [z]

Cultivar	32℃ (days)	Bud numbers	Embryos / plates
K-Y Cross	1	16	0.50 a[y]
	2	16	0.45 a
	3	16	0.08 ab
Taichung No.2	1	19	0.10 ab
	2	19	0.00 b
	3	18	0.00 b

z、y same as Table 3-1.

表 3-4 不同溫度處理 1 天對甘藍小孢子胚形成之影響 [z]

Cultivar	Treatment(℃)	Embryos / platey
K-Y Cross	32	0.20 b
	34	2.00 a
Taichung No.2	32	0.11 b
	34	0.00 b

z、y same as Table 3-1.

表 3-5 甘藍小孢子再生植株以流式細胞儀檢測之倍體數表現

Cultivar	Total tested plants	Ploidy level No. of plant（%）			
		C	2C	4C	Chimera[z]
K-Y Cross	58	17(29.3%)	25(43.1%)	2(3.4%)	14(24.1%)
Taichug No.2	2	0(0%)	2(100.0%)	0(0%)	0(0%)

z Chimera plants include C+2C and 2C+4C.

表 3-6 「初秋」甘藍單倍體以 1.2 mM 秋水仙素處理後之再生植株以流式細胞儀檢測之倍體數表現

Cultivar	Total tested plants	Ploidy level No. of plant（%）			
		C	2C	4C	Others[z]
K-Y Cross	13	2(15.4%)	5(38.5%)	2(15.4%)	4(30.8%)

z Others include chimera plants.

孤挺花組織培養種苗量化繁殖技術開發 利用鱗莖直徑約 3~5 mm 之組培苗作為培植體，進行 1.5~9% 蔗糖與 0~2 gL^{-1} 活性碳濃度組合之複因子試驗，結果顯示 6% 蔗糖配合 1~2 gL^{-1} 活性碳處理，對於增加組培苗之鱗莖直徑與鮮重最為有利，分別可達 8.0 mm 與 1.73~1.75 g，但是蔗糖濃度達 9% 時，對組培苗之生長會產生抑制效果。綜合而言，提高蔗糖濃度至 6%，可顯著提高孤挺花組培苗之鱗莖直徑、鮮重及根數，同時添加適量活性碳則具有協同增效蔗糖之效果 (表 3-7)。將「紅獅」1/4 鱗莖，以 65.0 μM GSH 或 32.5 μM GSH 溶液浸泡 2 hrs，再接種於含有 3% 蔗糖、1 mgL^{-1} BA 與 0.1 mgL^{-1} NAA 之 MS 固態培養基，每個組培鱗莖於照光條件培養 8 wks 後，平均可誘得 12.3 苗，為最佳增殖條件 (表 3-8)。利用不同濃度穀胱甘肽溶液噴施「紅獅」出瓶苗，於溫室環境栽培 32 wks 後之結果顯示，全株鮮重以 162.8 μM GSSG 處理之 36.4 mg 為最高，顯著高於其他處理與對照組 (表 3-9、圖 3-2)。

表 3-7 蔗糖與活性碳濃度對「孤挺花台農 1 號」組培苗生長之影響 [z]

Su(gL^{-1})	AC(gL^{-1})	Bulb Diameter(mm)	Fresh weight(g)	Roots number
15	0.0	4.2±0.1 e [y]	0.32±0.0 g	1.8±0.5 g
15	0.5	4.2±0.1 e	0.62±0.1 f	5.3±1.6 cd
15	1.0	4.7±0.5 e	0.75±0.0 ef	4.1±0.3 def
15	2.0	4.7±0.3 e	0.75±0.1 ef	3.1±1.0 f
30	0.0	4.7±0.3 e	0.35±0.0 g	3.8±1.3 ef
30	0.5	5.6±0.5 e	1.27±0.2 d	9.0±1.1 a
30	1.0	5.8±0.3 d	1.29±0.3 d	6.8±1.3 b
30	2.0	6.8±0.8 bc	1.54±0.2 bc	7.1±0.8 b
60	0.0	4.8±0.4 e	0.36±0.1 g	3.1±0.4 f
60	0.5	7.4±0.9 ab	1.34±0.2 cd	9.6±1.7 a
60	1.0	8.0±0.4 a	1.75±0.2 a	9.4±0.6 a
60	2.0	8.0±0.2 a	1.73±0.1 ab	8.8±0.4 a
90	0.0	4.5±0.1 e	0.22±0.0 g	1.3±0.5 g
90	0.5	6.5±0.6 c	0.70±0.1 ef	6.3±0.6 bc
90	1.0	6.6±0.4 c	0.88±0.2 e	6.1±0.7 bc
90	2.0	6.8±0.4 bc	0.75±0.0 ef	5.0±1.0 cde
Su		***[x]	***	***
AC		***	***	***
Su × AC		***	***	***

[z] *In vitro* bulb explants(about 4 mm in diameter)were cultured on MS medium containing 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA in combination with various concentrations of sucrose and activated charcoal(AC)for 10 wks of culture. Each treatment had 4 replications, and 3 explants were used in each replication.

[y] Means in the column followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test.

[x] F-test of ANOVA. *, ** and ***, significant at 5%, 1% and 0.1%, respectively.

表 3-8 照光或黑暗條件下穀胱甘肽對孤挺花「紅獅」組培苗增殖之影響 [z]

Illumination	Immersion	Treatment (conc.)	8 wks	12 wks
Light	1 hr	Control	10.7±0.3 bc[y]	12.3±0.9 bcd
		GSH 32.5 μM	8.7±0.3 de	9.3±0.3 gh
		GSH 65.0 μM	9.7±0.9 cd	11.7±0.3 cde
		GSSG 16.2 μM	9.3±0.3 cd	11.0±0.2 def
		GSSG 32.5 μM	12.0±0.6 ab	12.7±0.3 bc
	2 hrs	Control	10.0±0.6 cd	11.7±0.3 cde
		GSH 32.5 μM	10.3±0.3 c	11.0±0.6 def
		GSH 65.0 μM	12.3±0.9 a	14.7±0.8 a
		GSSG 16.2 μM	9.3±0.7 cd	10.7±0.3 efg
		GSSG 32.5 μM	12.3±0.3 a	13.7±0.3 ab
Dark	1 hr	Control	7.3±0.3 ef	7.3±0.3 ij
		GSH 32.5 μM	7.3±0.9 ef	8.0±0.6 hi
		GSH 65.0 μM	7.3±0.3 ef	9.7±0.7 fg
		GSSG 16.2 μM	7.0±0.1 fg	8.0±0.1 hi
		GSSG 32.5 μM	7.3±0.3 fb	8.0±0.2 hi
	2 hrs	Control	6.7±0.9 fb	7.3±0.3 ij
		GSH 32.5 μM	6.7±0.7 fb	6.7±0.9 ij
		GSH 65.0 μM	6.0±0.6 fg	6.0±0.6 j
		GSSG 16.2 μM	5.7±0.9 g	6.7±0.2 ij
		GSSG 32.5 μM	6.7±0.3 fg	6.9±0.3 ij

[z] One-quarter bulb explants were immersed into autoclaved water(control), GSH or GSSG solution for 1 hr or 2 hrs, and then inoculated on MS medium containing 3% sucrose, 1 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA under light or dark condition for 8 and 12 wks of culture.

[y] Means of plantlets per bulb in each column followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test.

表 3-9 穀胱甘肽對溫室環境孤挺花「紅獅」植株鱗莖直徑與鮮重之影響 z

Bulb size	Treatment	Concentration (μM)	Diameter of bulb (mm)	FW of bulb (g)	FW of leaf (g)	Total fresh weight (g)
Larger	Control	0	25.3±0.4 abc[y]	14.6±1.0 ab	16.8±0.2 fg	31.4±1.0 bcd
	GSH	162.8	26.0±0.3 ab	15.8±0.5 a	17.3±0.1 bc	33.1±0.5 b
	GSH	325.7	26.1±0.3 ab	15.0±0.7 ab	18.2±0.0 cde	33.2±0.8 b
	GSH	651.4	24.5±0.8 bcd	12.7±0.3 cd	13.7±1.2 h	26.4±1.3 g
	GSSG	81.4	23.1±1.3 cde	11.9±0.7 de	15.7±0.4 g	27.6±1.2 fg
	GSSG	162.8	27.4±1.2 a	16.3±0.5 a	20.1±0.2 ab	36.3±0.6 a
	GSSG	325.7	25.3±0.7 abc	13.9±0.1 bc	16.2±0.1 fg	30.1±0.2 cde
Smaller	Control	0	22.8±0.7 de	12.2±0.7 cd	20.4±0.5 a	32.6±1.1 bc
	GSH	162.8	23.7±0.4 cde	12.7±0.2 cd	18.8±0.3 bc	31.4±0.2 bcd
	GSH	325.7	22.6±0.6 de	11.6±0.7 de	17.1±0.6 ef	28.7±0.8 efg
	GSH	651.4	21.7±0.7 e	10.5±0.7 e	18.5±0.6 cd	29.0±1.3 ef
	GSSG	81.4	22.8±1.3 de	11.0±0.6 de	18.6±0.2 c	29.7±0.6 def
	GSSG	162.8	23.5±1.1 cde	12.6±0.6 cd	19.4±0.2 abc	32.1±0.8 bcd
	GSSG	325.7	23.5±0.6 cde	12.2±0.3 cde	20.0±0.3 ab	32.2±0.1 bc

[z] In vitro rooted larger(about 12 mm in bulb diameter)and smaller(about 8 mm in bulb diameter)plantlets of *H. hybridum* 'Red Lion' were planted on a mixed substrate (peat moss: vermiculite: perlite =2: 1: 1, v/v/v) for 8 wks of culture, then treated 5 times with various types and concentrations of glutathione (0,162.8, 325.7, 651.4 μM GSH and 0, 81.4, 162.8, 325.7 μM GSSG) from week 9th to week 25th per 4 wks, and investigated until 32 wks of cultivation. Each treatment had 3 replications, and 5 plants per replications, 50 ml solution was sprayed on 15 plants.

[y] Means in the column followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test.

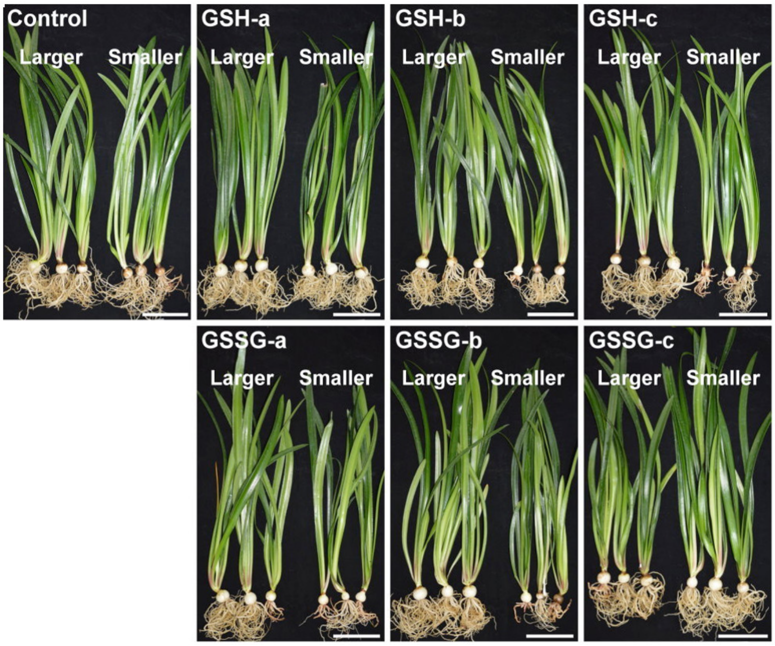

圖 3-2 孤挺花「紅獅」出瓶組培苗於溫室環境下生長達 32 wks 之植株生長情形。組培苗出瓶種植於混合介質 (泥炭苔：蛭石：珍珠石 =2：1：1，體積比)，於種植後第 8 wks 開始處理，每 4 wks 噴施純水 (Control)、GSH(162.8 μM、325.7 μM 及 651.4 μM；GSH-a、-b、-c) 及 GSSG (81.4 μM、162.8 μM 及 325.7 μM；GSSG-a、-b、-c) 直到種植後第 25 wks，共噴施處理 5 次，直到栽培 32 wks 後進行調查；每處理 3 重複，每重複 5 株，每 15 株噴施 50 mL 處理溶液。大苗 (Larger) 與小苗 (Smaller) 種植達 32 wks 後，植株之生長與發根情形。Bars=10 cm。

薑組織培養種苗量化繁殖技術開發 本研究利用「廣東薑」與「竹薑」根莖之新生芽體為培植體，建立其組織培養苗大量繁殖方式。切取長約 1 cm 之新生根莖芽體作為培植體，先利用 75% 酒精處理 30 sec 後，再以 0.6% NaOCl 消毒 15 min，培養於含有 0.4 mgL^{-1} BA 之 B5 固態培養基中 12 wks 後，建立無菌培養瓶苗 (圖 3-3)。將「廣東薑」與「竹薑」之組培根莖培養於含有 0.5~2.0 mgL^{-1} BA 與 0.1 mgL^{-1} NAA 之 B5 固態培養基 8 wks 後，兩品種每個培植體平均可誘得 4.8~6.0 株，苗高約 1.8~2.6 cm 之組培苗，且瓶苗具有良好之根系；提高 BA 濃度至 4 mgL^{-1} 雖可增加苗數，但苗高顯著降低；反之，對照組之組培苗雖然較高，但其苗數顯著較少 (表 3-10)。

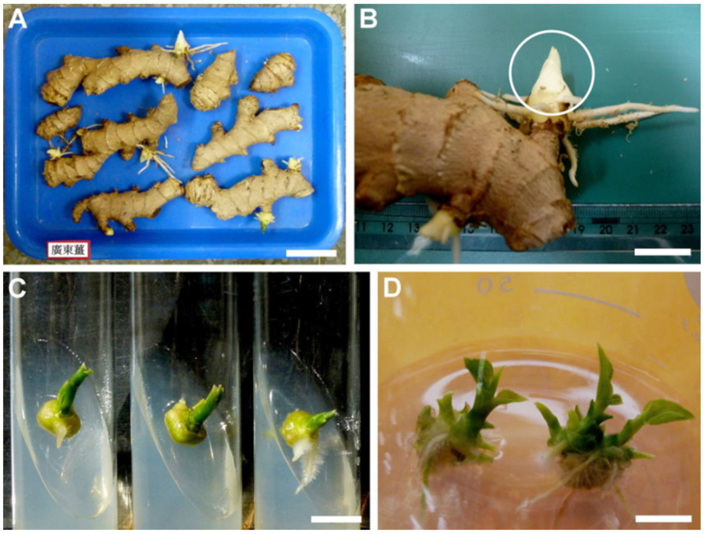

圖 3-3 建立「廣東薑」組織培養初代培養。新生根莖芽體萌發於採自田間之根莖 (A，Bar= 5 cm)(B，Bar=2 cm)；根莖芽體培植體培養於含有 0.4 mg L^{-1} BA 之 B5 固態培養基 4 wks 後所形成之芽體 (C，Bar=1 cm)；將此無菌芽體直接繼代於相同組成之固態培養基達 8 wks 後所形成之瓶苗增殖與生長情形 (D，Bar=1 cm)。

表 3-10 BA 濃度於固態培養下對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之影響 [z]

Plant growth regulator		No. of plantlets	Plantlet height (cm)	Plantlet height		
BA	NAA			< 2 cm	2~4 cm	> 4 cm
− (mgL^{-1}) −					− (%) −	
'Guang Dong'						
0	0.1	4.4±0.4 c [y]	2.2±0.1 a	34.2±11.2 b	57.6±17.5 a	8.1±2.1 a
0.5	0.1	5.6±0.7 bc	1.8±0.2 b	32.6±12.6 b	67.4±12.6 a	0.0 b
1.0	0.1	5.4±1.1 bc	1.8±0.2 b	43.5±18.8 b	56.5±18.8 a	0.0 b
2.0	0.1	6.0±0.5 ab	1.8±0.1 b	33.8±11.7 b	66.2±11.7 a	0.0 b
4.0	0.1	7.2±0.5 a	1.3±0.2 c	71.2±10.6 a	28.8±10.6 b	0.0 b
'Chu'						
0	0.1	4.1±0.4 cy	3.2±0.3 a	19.6±8.2 ab	30.4±9.3 b	50.0±1.1 a
0.5	0.1	4.8±0.4 bc	2.6±0.3 b	13.3±3.1 b	80.1±6.8 a	6.7±1.7 b
1.0	0.1	4.9±0.2 bc	2.2±0.2 bc	22.8±5.0 ab	77.2±6.4 a	0.0 c
2.0	0.1	6.0±0.6 b	2.1±0.1 cd	27.0±8.4 ab	73.0±8.4 a	0.0 c
4.0	0.1	7.7±1.8 a	1.8±0.1 d	32.1±8.1 a	67.9±8.1 a	0.0 c

[z] Explants were cultured on B5 medium containing various concentration of BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 8 wks. Nine explants were used in each treatment.

[y] Means in each same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by LSD test.

藍紫色蝴蝶蘭育種之研究 以花寶 1 號為基礎培養基，配合 0.1% 活性炭，1~2% 蔗糖以及 2.5%~5.0% 之香蕉與馬鈴薯添加，將所採收雜交組合 CYT193、CYT194、CYT198 果莢進行無菌播種皆可獲得實生後代，之後藉由調整蔗糖與蔬果添加物之濃度完成繼代培養並出瓶種植，其中雜交組合 CYT193 可獲得實生小苗 124 株，CYT194 實生苗 63 株，CYT198 實生苗 226 株 (表 3-11)。CYT167、CYT177 二個藍紫色蝴蝶蘭雜交組合可成功獲得 83~121 株實生後代 (表 3-12)，並進行藍紫色系之單株選拔，其中於 CYT167 可選拔出具有金黃色花瓣與淡藍紫色唇瓣優良單株，而於 CYT177 可選拔出雪白花瓣藍紫色插角與深藍紫色唇瓣之優良單株 (圖 3-4)，二者皆具有香氣，花期在夏季，由於實生苗株尚未全數開花，爾後將繼續選拔優良單株。經流式細胞儀檢測確定倍體數 (圖 3-5) 並比較藍紫色蝴蝶蘭 *P.* Siam Treasure 2 倍體與秋水仙素誘導所得之 4 倍體植株的園藝性狀，結果顯示 4 倍體 *P.* Siam Treasure 花徑雖未較 2 倍體大，但花朵質地較佳，且植株與花梗型態則顯示出明顯差異，花梗較粗矮，葉片較寬短、厚 (表 3-13、圖 3-6)。有關 4 倍體之雜交親和性尚需進一步測試。

表 3-11 藍紫色蝴蝶蘭親本之雜交組合結果調查

雜交組合編號	藍紫色親本系統	實生苗數	胚與小苗畸形率 (%)	小苗型態與生長概況
CYT193	*Phal.* violacea 'Indigo' 母本	124	0	正常
CYT194	*Phal.* violacea 'Indigo' 父本	63	0	正常
CYT198	*Phal.* violacea 'Taiwan' 父本	226	0	正常

表 3-12 選拔之雜交組合 CYT167、CYT177 之實生苗藍紫花色之表現

雜交組合編號	藍紫色親本系統	實生苗數	花色表現	香氣	小苗型態與生長概況
CYT 167	*Phal.* violacea 'Taiwan' (父本)	83	金黃花瓣淡藍唇辦	濃郁	正常
CYT 177	*Phal.* violacea 'Taiwan' (父本)	121	雪白花瓣藍插角	明顯	正常

表 3-13 比較 2 倍體藍紫色蝴蝶蘭 *P.* Siam Treasure 與誘導所得之 4 倍體植株之園藝性狀

倍體數	花徑 (cm)	梗長 (cm)	梗徑 (mm)	葉長 (cm)	葉寬 (cm)	葉厚 (mm)
2 倍體	3.9 a	33.7 a	2.5 b	12.2 a	4.0 a	1.6 b
4 倍體	3.9 a	19.6 b	3.2 a	8.6 b	3.6 a	2.2 a

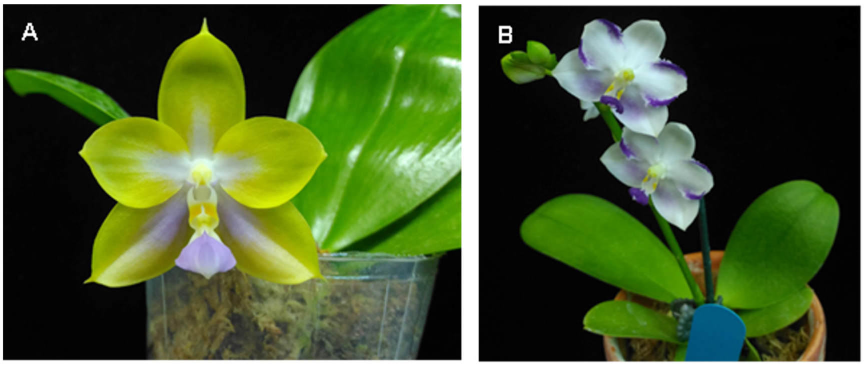

圖 3-4 於藍紫色蝴蝶蘭雜交組合所選拔優良單株 (A) 雜交編號 CYT167 苗株具有金黃色花瓣與淡藍紫色唇瓣，具濃郁香氣；(B) 雜交編號 CYT177 苗株具有雪白花瓣藍紫色插角與深藍紫色唇瓣，具明顯香氣。

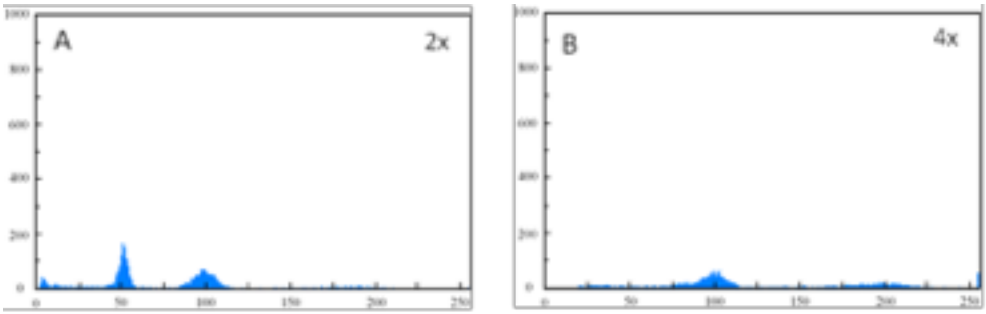

圖 3-5 利用流式細胞儀分析藍紫色蝴蝶蘭 *P.* Siam Treasure(A)2x 倍數體；(B)4x 倍數體之圖譜。

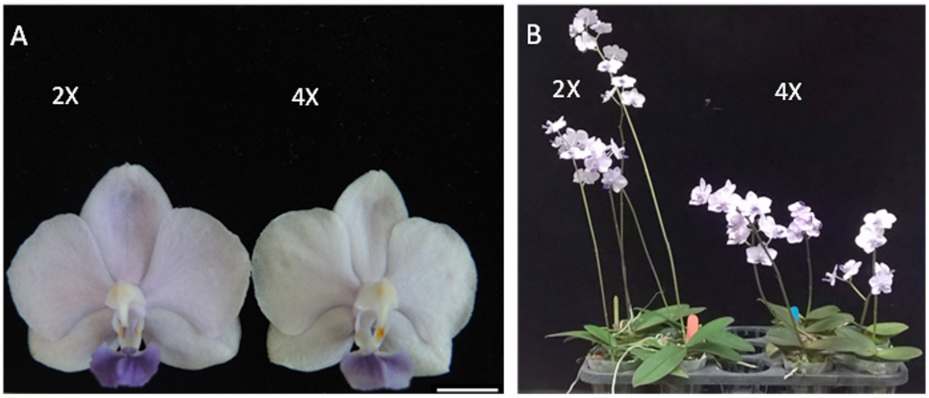

圖 3-6 藍紫色蝴蝶蘭 *P.* Siam Treasure(A)2 倍體與 4 倍體之花朵與；(B) 植株形態。

白雪文心蘭組培優化 將擬原球體已分化成約 3 cm 高之「文心蘭台農 4 號 - 白雪」組培苗小苗，接種於基本培養基為全量之 MS 基本鹽類，20 gL^{-1} 蔗糖，並添加 3 gL^{-1} tryptone、50 gL^{-1} 香蕉和 50 gL^{-1} 馬鈴薯，每瓶接種 60 個培植體，4 重覆，分別將瓶苗放置於培養室以及有風扇水牆之溫室等不同培養環境進行子瓶階段之培養，培養室培養環境為溫度 25℃ ±1℃，光照強度為 38 $\mu Mm^{-2}s^{-1}$ 及 14 h 光週期，12 週後進行性狀調查。將子瓶階段之瓶苗於培養室以及水牆溫室環境下培養，小苗生長皆良好，且無叢生狀生長不佳之小苗，然二者培養環境間假球莖形成率、芽數、株高、葉數、葉長、葉寬、根數以及鮮重等性狀具顯著差異 (表 3-14)。觀察植株生長型態顯示出於培養室培養之瓶苗因光照強度較不足而稍有徒長現象，葉片較細長，葉色黃綠，而於水牆溫室環境下光線較強，於此環境下培養之瓶苗植株較翠綠，而且根數與葉數較多 (圖 3-7)。本研究於子瓶階段即移至水牆溫室環境中培養，評估「文心蘭台農 4 號 - 白雪」組培苗是否適應此培養環境條件，雖瓶苗性狀部分劣於培養於培養室之瓶苗，但植株較為精壯翠綠，且根數與葉數較多，整體小苗品質較佳，顯示出「文心蘭台農 4 號 - 白雪」組培苗應可適合於商業化瓶苗生產培養環境。

表 3-14 子瓶苗於不同培養環境對「文心蘭台農 4 號 - 白雪」小苗生長之影響

培養環境	小苗假球莖 %	芽數	株高 (cm)	葉數	最大葉長 (cm)	最大葉寬 (cm)	根數	鮮重 (g)
培養室	75.3±7.5 a	1.3±0.1 a	13.7±0.4 a	6.5±0.2 b	10.4±0.3 a	0.5±0.0 b	6.0±0.2 b	0.8±0.0 b
水牆溫室	8.7±4.0 b	1.0±0.0 b	12.3±0.3 b	9.2±0.2 a	9.3±0.3 b	0.6±0.0 a	6.9±0.1 a	1.2±0.0 a

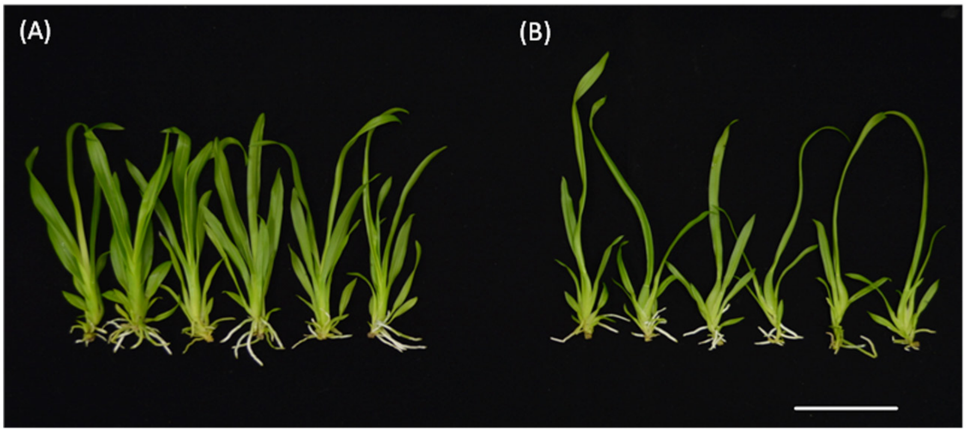

圖 3-7 子瓶苗於 (A) 水牆溫室以及 (B) 培養室不同培養環境對「文心蘭台農 4 號 - 白雪」小苗生長之影響；Bar=5 cm。

作物機能

苦茶油品質關鍵指標之研究 107 年度收集臺灣與大陸地區生產市售苦茶油共 47 件，完成品質與成分分析；油脂品質的科學指標酸價 (AV) 與過氧化價 (POV) 越低越好。104 年臺灣公告苦茶油的國家品質標準 (CNS 15827)，一級油 AV<1.5、POV<6.0，二級油 AV<3.0、POV<10。由於國產壓榨苦茶油過去已經以動物試驗證實具有護腦、護眼、護胃、護肝等功效，內含有許多微量功效成分，所以為能穩定生產優質的功效苦茶油，必須尋找並且標定產品成分規格，意即 CMC(chemistry, manufacturing, control) 製程是追求品質的關鍵策略。本年度先運用油脂氧化安定指數 (oil stability index , OSI) 作為品質與功效的關鍵參數 (越高越好)，因為油脂如果能擁有高抗氧化能力，除了油脂的本質結構之外，必然含有高量抗氧化物質，預期有助於降低體內炎症與癌化反應。選擇國產市售苦茶油 12 件，分析 AV、POV、總酚含量 (total phenols, TP)、還原力 (reducing power, RP)(表 3-15)，以及 OSI(表 3-16)；並分別以 AV vs OSI、POV vs OSI、TP vs OSI、RP vs OSI 作圖，結果顯示總酚含量、還原力與 OSI 的相關性高，但其中有 2 個樣品屬於離異點，此外，酸價與 OSI 無明顯關係，然而過氧化價則與 OSI 有明顯相關性，因此就品質而言，過氧化價的重要性高於酸價，並且油脂 CMC 製程初期可以總酚含量作為機能性成分指標，排除 2 個樣品離異值之關係方程式為 y=1.4385x+1.0596、R^2=0.7314(x, OSI; y, TP)。

表 3-15 分析 12 件國產市售苦茶油之酸價 (AV)、過氧化價 (POV)、總酚含量 (TP)、還原力 (RP)

序號	品名	酸價 (AV)		過氧化價 (POV)		總酚含量 (TP)		還原力 (RP)	
		mg KOH/ g		meq/kg		Gallic acid(mg mL/oil)		Trolox(mol/mL oil)	
		平均值	標準偏差	平均值	標準偏差	平均值	標準偏差	平均值	標準偏差
1	南投大果苦茶油	1.007	0.02	6.41	0.48	5.214	0.26	0.677	0.06
2	東勢大果苦茶油	1.138	0.08	9.48	0.35	3.941	0.30	0.214	0.01
3	苗栗大果苦茶油	1.143	0.00	4.48	0.34	6.376	0.18	1.702	0.05
4	苗栗小果苦茶油	0.259	0.00	18.30	0.16	5.596	0.45	0.492	0.01
5	梅山茶油	0.673	0.00	3.68	0.05	9.034	0.52	2.040	0.04
6	小果苦茶油	0.323	0.31	31.13	0.14	5.469	0.35	0.083	0.02
7	白河大果 150℃	1.094	0.00	8.29	0.21	6.392	0.63	0.830	0.09
8	白河大果 160℃	1.119	0.02	5.34	0.17	11.061	0.95	4.556	0.13
9	白河大果 170℃	0.963	0.42	4.23	0.18	23.624	0.80	14.529	0.68
10	梅山茶油 - 大籽 2	0.411	0.38	3.47	0.06	10.721	0.13	5.758	0.25
11	梅山茶油 - 小籽 3	0.722	0.08	6.99	0.01	10.573	0.26	5.279	0.25
12	梅山茶油 - 小果 4	0.742	0.00	4.02	0.06	10.891	0.10	6.321	0.29

表 3-16 分析 12 件國產市售苦茶油之氧化安定指數 (OSI, oil stability index)

序號	品名	110℃	120℃	130℃	r
1	南投大果苦茶油	3.42	2.12	1.29	0.99988
2	東勢大果苦茶油	4.13	2.36	1.39	0.99974
3	苗栗大果苦茶油	9.92	6.03	3.16	0.99442
4	苗栗小果苦茶油	2.94	1.94	1.20	0.99827
5	梅山茶油	12.33	6.36	3.07	0.99924
6	小果苦茶油	1.23	0.61	0.38	0.98803
7	白河大果 150°C	2.02	0.98	0.57	0.99320
8	白河大果 160°C	7.51	4.04	1.92	0.99726
9	白河大果 170°C	11.32	6.21	3.08	0.99800
10	梅山茶油 - 大籽 2	8.61	3.78	2.16	0.98759
11	梅山茶油 - 小籽 3	8.03	4.43	2.21	0.99798
12	梅山茶油 - 小果 4	8.41	4.61	2.35	0.99892

大豆發酵前後異黃酮變化差異之研究 篩選具有高異黃酮及合適農藝性狀之品種，經寡孢根黴菌發酵後，分析機能性成分之變化。研究結果顯示從生豆、煮熟脫去種皮至發酵完成，去醣基異黃酮逐漸提高，尤其發酵後提高更為顯著，且隨發酵溫度提升以及發酵時間增加，去醣基異黃酮含量逐漸提高，醣基異黃酮則逐漸減少（圖 3-8）。在市售大豆方面，發酵後去醣基異黃酮皆有提升，且醣基異黃酮亦明顯下降，其中穀堡基改與穀堡非基改大豆在發酵前已有較高之去醣基異黃酮，而統一生機大豆在發酵前則未測得去醣基異黃酮，推測較長時間儲存可能仍有水解作用進行，使去醣基異黃酮上升。國產大豆方面，在發酵前去醣基異黃酮含量皆甚低，發酵後皆有顯著提升，其中以「金珠」提升幅度最為顯著，去醣基異黃酮含量超過 1,000 μg/g（圖 3-9）。種原庫大豆方面，同樣在發酵前去醣基異黃酮含量皆甚低，發酵後皆有顯著提升，其中發酵後去醣基異黃酮含量超過 400 μg/g 者有 01A01687、95A05659、96A00099、96A00135。經由相關分析，無論是國產大豆或種原庫大豆，發酵前之總異黃酮含量與發酵後之去醣基異黃酮含量皆具有正相關性，然而並非總異黃酮含量較高者經發酵後即有較高之去醣基異黃酮，其中是否有其他因素影響發酵時異黃酮之水解作用有待進一步試驗釐清。

（A） （B）

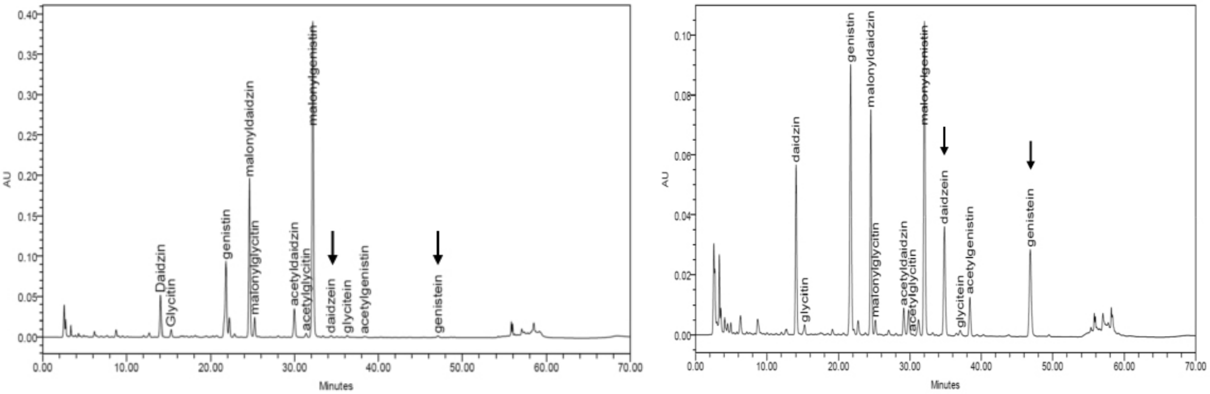

圖 3-8 （A）發酵前之大豆異黃酮 HPLC 分析圖譜；（B）發酵後之大豆異黃酮 HPLC 分析圖譜。箭頭標示處顯示去醣基異黃酮在發酵後明顯增加。

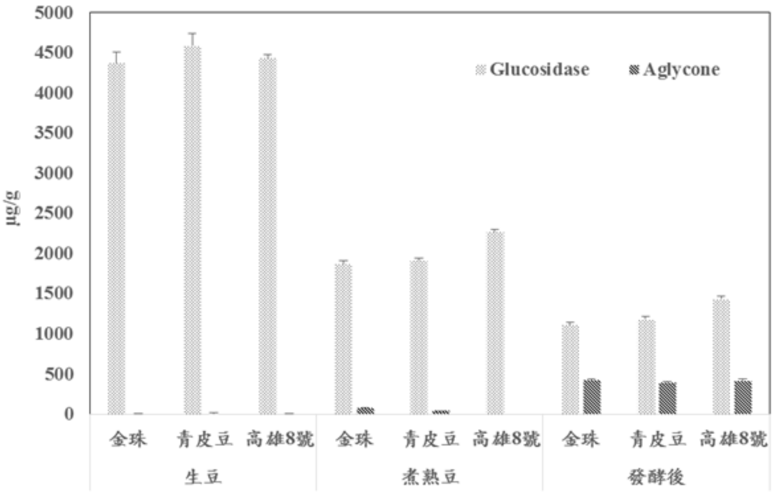

圖 3-9　3 個大豆品種分別在生豆、煮熟、發酵後等三個階段之醣基異黃酮（Glucoside）及去醣基異黃酮（Aglycone）含量分析結果比較。生豆為為採收後乾燥之大豆種實；煮熟豆為生豆浸水 16 小時再蒸煮 20 分鐘後脫去種皮；發酵後為煮熟豆接種 1% 之寡孢根黴菌菌粉，於 32℃發酵 24 小時。

霧台黃精之基原鑑定及抗氧化力分析　霧台地區原生一種黃精屬植物 (以下簡稱霧台黃精)，為當地居民利用已久，多用於滋補元氣、治咳潤肺。因長期採集，野生族群日益稀少，近年開始在林下復育霧台黃精，除恢復傳統植栽進行物種保育外，更期待開發其機能功效，作為新興保健原料。霧台黃精其確切基原尚未驗證，本研究以形態及分子親緣關係鑑定其基原。霧台黃精株高大於 50 公分、葉寬大於 3 公分、每花序 2~5 朵花、花被筒長 5 mm 以上，花有總梗 (圖 3-10)。在臺灣記載的 4 種黃精屬植物中，與阿里山黃精之形態最為符合。以葉綠體之 *trn*C-*pet*N 進行分子親緣分析，發現自霧台鄉採集的 3 個霧台黃精族群 (WuTai-1-3) 的確與阿里山黃精形成單源群 (Bootstrap value = 89)(圖 3-11)，支持自形態特徵得到的假設。總結上述，霧台黃精由形態及分子之鑑定結果，其基原應為阿里山黃精，學名為 *Polygonatum arisanense*，亦可稱其別名萎蕤。為了解霧台黃精之機能性，我們利用清除 ABTS 自由基技術探討霧台黃精不同溶劑萃取物之抗氧化效果。霧台黃精使用 50% 酒精及水萃取，都可達到 50% 以上的萃取率，若以 95% 酒精萃取，則萃取率僅有 8%，顯示霧台黃精大部分為水溶性成分。霧台黃精地下部以酒精萃取物之抗氧化力較高 (圖 3-12)，其 1 mg/ml 萃取物的抗氧化力約等同 0.04 mM 的 Trolox，大約等於龍眼花正己醇萃取物的抗氧化力。

圖 3-10　霧台黃精植物形態。左上：全株，右上：葉，左下：花，右下：根莖。

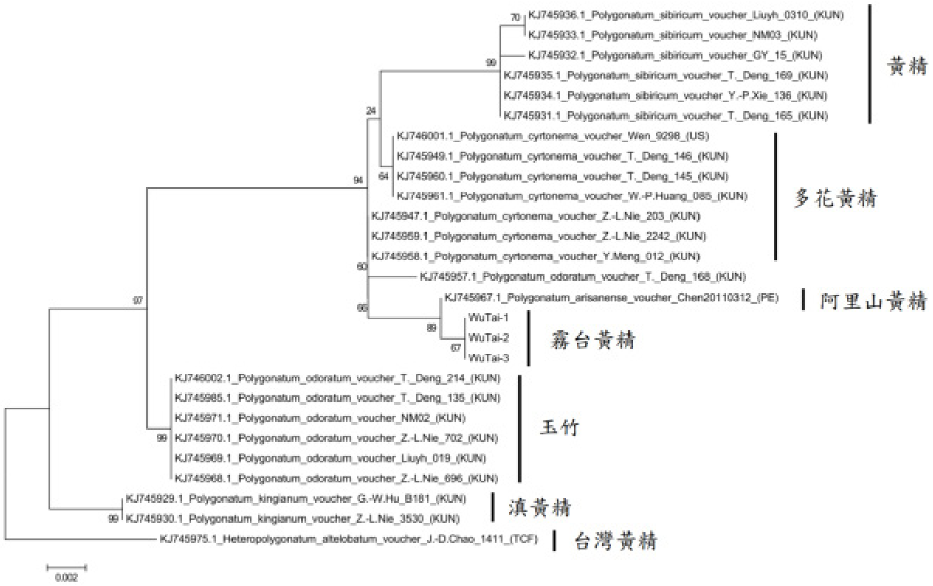

圖 3-11 由葉綠體 *trn*C-*pet*N 片段得到的最大似然 (Maximum likelihood) 親緣樹。親緣分析軟體為 MEGA5，取代模式設定為 Jukes-Cantor Model，節上數字為 Bootstrap value。霧台鄉萎蕤族群代號為 WuTai-1-3，外群則設定為臺灣黃精。

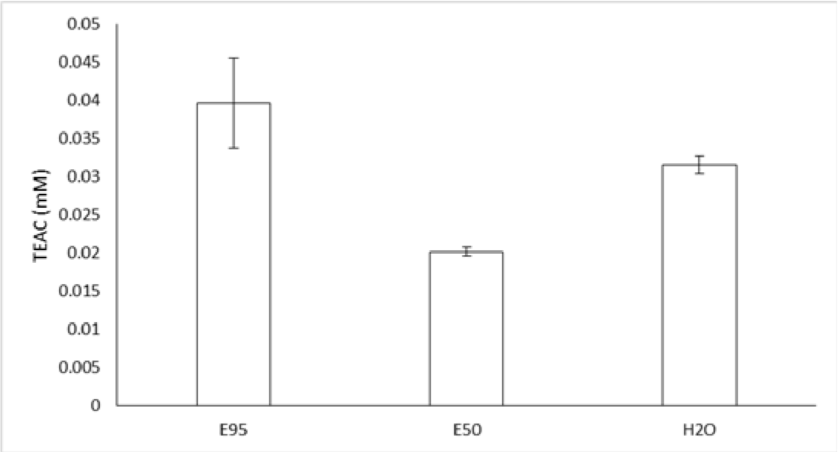

圖 3-12 霧台黃精不同溶劑之粗萃取物在 1 mg/ml 濃度時清除 ABTS 自由基之 Trolox 當量 (TEAC) 值，標準差為 3 個機械性重複。E95：95% 酒精萃取物；E50：50% 酒精萃取物；H_2O：水萃取物。

分子遺傳

重要性狀外表型篩選平台之建立　本計畫擬針對國家種原庫收集保存之 2 萬多份大豆種原，建立核心種原。進而利用新世代基因型及表型體分析技術，建置全基因組 SNP 及表型體資料庫。並建立大數據技術，探討其基因型與外表型間的關聯性，作為大豆快速精準育種平台的基礎。因此，本計畫在 107 年已完成：(1) 自 5,203 份初級核心種原，進一步收斂汰除重複，建立 226 個核心收集種原 (圖 3-13)；(2) 2,207 個核心種原之 180K Axiom® SoyaSNP array 分析，發現 149,042 個 SNPs，可進入後續 GWAS 分析；(3) 建立表型體大數據整合分析平台，探索驗證 79 篇蔬食大豆重要農藝性狀文獻，其中機能性 (異黃酮) 共計 1,432 筆基因型資料，耐寒共計 1,650 筆基因型資料，大粒種子共計 4,333 筆基因型資料，以及果莢常綠共計 338 筆基因型資料；(4) 建立重要性狀資料庫，包含 117 筆異黃酮資料、372 筆耐寒資料及 117 筆大豆粒型資料；(5) 完成農試所初級表型體設施 (圖 3-14) 測試，並建立 >500 筆表型體分析及影像資料。這些結果除了透過所建構的快速精準育種平臺育成抗環境逆境與特殊農藝性狀之新品種外，亦能使臺灣以多元獨特之商業品種站穩世界市場。

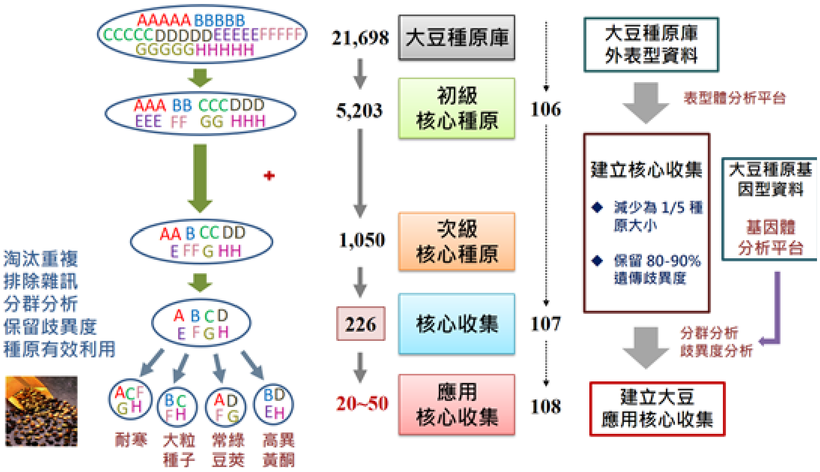

圖 3-13　蔬食大豆應用核心收集之建立流程圖。

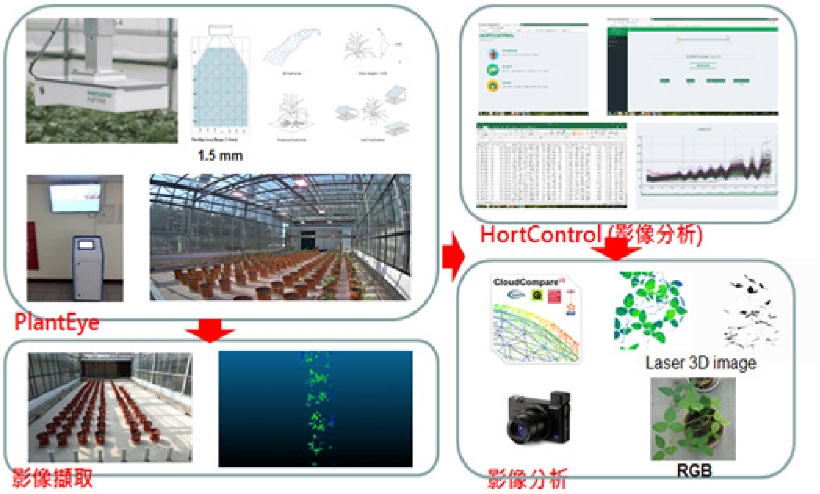

圖 3-14　荷蘭 Phenospex PlantEye 溫室及表型體影像分析平台。

甜瓜種原重要抗耐逆境資訊之開發及應用 甜瓜（*Cucumis melo* L.）為全球第三大葫蘆科作物，不論在果實或種苗上皆具有極高經濟價值，但在氣候變遷之下，甜瓜栽培上面對更嚴峻之挑戰，因此急需耐逆境之品種，以穩定生產並維護食品及環境安全。遺傳資源為育種之根本，因此若能掌握甜瓜種原特性（尤其果實特性及抗病性），並結合基因體資訊，將能提升甜瓜種原之應用性及加速育種之效率。本研究去年（106 年）已建立 102 個甜瓜核心種原（圖 3-15），本年度進行甜瓜核心種原的特性調查（春秋兩季），包含 30 個園藝性狀調查、白粉病（*Podosphaera xanthii* race 1）抗感性評估及矮南瓜黃化嵌紋病毒（Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV）抗感性評估，結果顯示 34 個種原具白粉病抗性，72 個種原具 ZYMV 抗性，後續將持續進行更多病害之評估，以完善種原抗病性資料。另外亦與臺灣大學農藝系合作，結合外表型及基因型資訊，進行全基因體關連性分析（Genome wide association study, GWAS），研究結果顯示甜瓜核心種原對白粉病 race 1 之抗性在染色體 2、5 及 6 號具有顯著相關之位點，後續將進行此些位點之驗證，待確認白粉病抗性基因存在後，配合 DNA 分子標誌，將可應用於抗病育種中。

圖 3-15　甜瓜核心種原之多樣化果實外觀。遺傳資源為育種之根本，因此若能掌握甜瓜種原特性（尤其果實特性及抗病性），將能提升甜瓜種原之應用性並縮短育種時間。

建構異源基因表現之水稻分子農場 本研究已建立穩定的水稻基因轉殖平台。因此，積極發展相關之表現系統。首先，利用水稻表現抗高血壓胜肽 (GVYPHK、PTHIKW 及 VYPHK)，以測試表現系統，故先構築 pCAMBIA-*Ubi-5XGVYPHK*、pCAMIBA-*Ubi-5XPTHIKW*、pCAMBIA-*Ubi-5XVYPHK* 等表現載體，經由農桿菌媒介轉形，分別取得擬 T0 轉殖系。進而將這些擬轉殖株進行 PCR 檢測，結果發現大部分植株皆可增幅到目標基因 (圖 3-16)，顯示重組片段基因已導入水稻基因組。另一方面，生產攜帶蛋白質 -CGTase 作為抗原生產檢測抗體。試驗結果顯示，稀釋至 60,000 倍的抗體，仍可偵測 CGTase，顯示抗體效價很高 (圖 3-17)。同時在秈稻轉殖平台建立部分，目前已成功取得 *OsRT(OsRetrotransposon)* 水稻反轉錄轉座子基因擬轉殖株 (圖 3-18)，同時也觀察到 pCAMBIA-*Ubi1-ZsGFP* 綠螢光蛋白質之表現，這些結果可作為未來發展秈稻基因功能驗證平台的基礎。

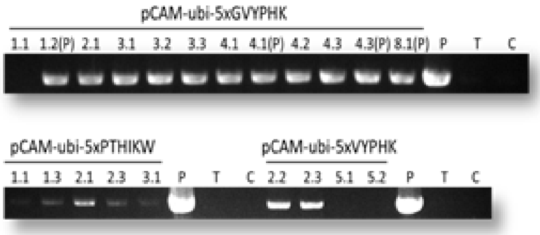

圖 3-16　抗高血壓胜肽 T0 轉殖系分子檢測。
P: plasmid DNA；T:TNG67；C:pCAMBIA1300

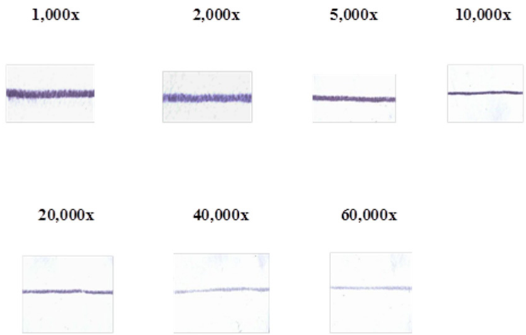

圖 3-17　CGTase 抗血清效價之測試。

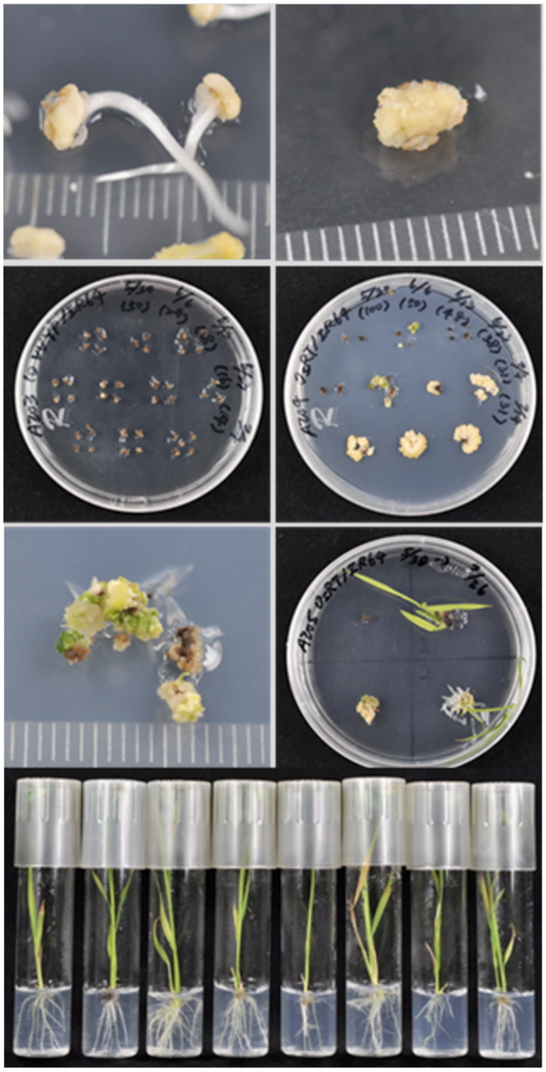

圖 3-18 *OsRT(OsRetrotransposon)* 轉殖篩選與再生之流程。

彩色辣椒核心種原之建立與利用 多樣性種原的蒐集與評估有助於提升作物育種效率。種原評估工作包含園藝性狀調查與遺傳背景分析，分子標誌則是快速評估種原遺傳歧異性的工具之一。本研究進行 63 份番椒 (*Capsicum annuum*) 種原之遺傳歧異性分析，以及辣味、果色與抗病性基因型分析，計完成 59 個收集系 250 個單株的 34 個園藝性狀之調查 (包含 11 個植株性狀、7 個開花性狀和 16 個果實性狀) 與資料建置，並獲得 241 個單株之 S1 採種 (每單株精選種子數 100 粒以上)。針對辣味特性，利用 allele specific marker，進行苗期辣味基因型分析同時對照外表型。此 63 個收集系 285 單株辣味基因型分析結果：37 個收集系為辣椒，24 個收集系為甜椒，3 個收集系為 (辣椒 / 甜椒) 混合系。經 285 個單株之辣味官能性測試 (3 人以上) 結果，均符合苗期以葉片 DNA 進行辣味基因型分析結果。本年度亦篩選出 9 個抗病性分析用候選分子標誌，分別為 (1)CMV_*Cmr1* resistance CAPS marker：Catm-int1；(2) Potyvirus(TEV, PVY, PepMoV) resistance gene *pvr1* 之 CAPS marker；(3) Potyvirus (TEV, TVY, PepMoV) resistance gene *pvr2*[1,2,3] 之 SNP marker；(4)Potyvirus (PVY, PepMoV) resistance gene *pvr4* 之 CAPS marker；(5)TMV_L^4 (Tobamovirus) resistance SCAR marker：060I2END ；(6)TSWV_*Sw5* (Tospovirus, Tomato spotted wilt virus) resistance CAPS marker：SCAC568；(7)Bacterial spot(*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*)resistance gene Bs3(Yang *et al*. 2009) SCAR marker；(8)*Phytophthora capsici* resistance SCAR marker：OpD04.717；(9)Root-knot namatode resistance gene *Me1* InDel marker。經測試 63 個番椒種原結果，其中 23 個辣椒種原收集系，分別具有 1~4 種不同抗病性分子標誌。

生物技術